



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108956982 A

(43)申请公布日 2018.12.07

(21)申请号 201810746013.1

(22)申请日 2018.07.09

(71)申请人 广州华澳生物科技有限公司

地址 510000 广东省广州市广州高新技术
产业开发区科学城开源大道11号B3栋
第五层505室

(72)发明人 于龙波 于永涛 黎权 刘日俊

(51)Int.Cl.

G01N 33/564(2006.01)

G01N 33/533(2006.01)

G01N 33/543(2006.01)

G01N 33/58(2006.01)

G01N 33/68(2006.01)

权利要求书2页 说明书6页 附图4页

(54)发明名称

一种类风湿性关节炎标志物联合定量检测
试纸及其制备方法

(57)摘要

一种类风湿性关节炎标志物联合定量检测试纸,所述类风湿性关节炎标志物为类风湿因子、抗环瓜氨酸多肽抗体与C-反应蛋白,试纸条包括样品垫、类风湿性关节炎标志物抗体磁性稀土荧光微球标记垫、包被膜和吸水垫,包被膜上设有三条类风湿性关节炎标志物定量检测线和一条质控区C线,利用磁场将样本中的被测物质浓缩后,利用低背景、高灵敏度的荧光免疫层析法,进行检测被测物质,解决了POCT类产品灵敏度低的问题。可以避免免疫侧向层析试剂检测血液样本时,为降低血液中其他物质的干扰。

类风湿因子测定方法精密度试验结果

测试 \ 浓度 (IU/mL)	17	100	250
Test 1	17.30	90.83	232.15
Test 2	18.39	95.82	242.86
Test 3	18.47	102.62	271.47
Test 4	16.71	99.37	266.70
Test 5	17.35	107.62	243.32
Test 6	17.63	101.93	254.56
Test 7	17.82	94.85	270.44
Test 8	18.09	93.39	245.90
Test 9	17.64	90.49	248.23
Test 10	15.43	104.63	264.75
均值	17.48	98.16	254.04
SD 值	0.85	5.65	12.91
CV	4.85%	5.75%	5.08%

1. 一种类风湿性关节炎标志物联合定量检测试纸,所述类风湿性关节炎标志物为类风湿因子、抗环瓜氨酸多肽抗体、C-反应蛋白,其特征在于:所述类风湿性关节炎标志物联合定量检测试纸包括盒体,所述盒体包括底板与盒盖,所述盒体内设有检测试纸,所述检测试纸下方设有底板,检测试纸上方与盒盖连接;所述盒盖设有通孔区;所述检测试纸上方设有检测区,检测区与通孔区相对应;所述检测区包括样品垫、类风湿性关节炎标志物抗体磁性稀土荧光微球标记垫、包被膜和吸水垫,所述包被膜上设有三条类风湿性关节炎标志物定量检测线和一条质控区C线,所述检测线与质控区C线平行排列。

2. 根据权利要求1所述的一种类风湿性关节炎标志物联合定量检测试纸,其特征在于:所述类风湿性关节炎标志物抗体磁性稀土荧光微球为由高分子材料包裹磁性稀土荧光复合物,所述磁性稀土荧光微球的球径为10-500nm,所述荧光发射波长范围为400-800nm,纳米微球表面修饰活性基团为氨基、羧基或巯基。

3. 根据权利要求1所述的一种类风湿性关节炎标志物联合定量检测试纸,其特征在于:所述包被膜两端分别与吸水垫和类风湿性关节炎标志物抗体标记垫相互交叠连接;所述包被膜为硝酸纤维素膜;所述类风湿性关节炎标志物抗体标记垫上方压贴有样品垫,所述样品垫为玻璃纤维样品垫。

4. 根据权利要求1所述的一种类风湿性关节炎标志物联合定量检测试纸,其特征在于:所述类风湿性关节炎标志物抗体磁性稀土荧光微球标记垫为玻璃纤维或聚酯纤维。

5. 一种类风湿性关节炎标志物联合定量检测试纸制备方法,包括类风湿性关节炎标志物抗体标记与制备检测试纸,所述类风湿性关节炎标志物抗体标记步骤:

① 用羧基化聚苯乙烯微球包裹 Eu^{3+} - Fe_3O_4 复合物制备的磁性稀土荧光微球,粒径200nm,固含量为1%;

② 取上述微球1mL,加入5mL pH 7.0 0.02M 3-(N-吗琳代)丙磺酸缓冲液(MOPS),混匀,25000rpm离心10min,弃上清;再加入5mL MOPS,90W超声,工作2s,间歇5s,重复2次,25000rpm离心10min,弃上清;

③ 再次加入5mL MOPS,90W超声,工作2s,间歇5s,重复2次,完成对微球的清洗;

④ 在清洗后微球中加入15mg EDC和50mg sulfo-NHS,涡旋混匀后,37℃反应15min;

⑤ 反应完成后,加入2-巯基乙醇8.6μl,终止羧基的活化;

⑥ 分别加入类风湿因子、抗环瓜氨酸多肽抗体、C-反应蛋白对应抗体各1mg,置于旋转培养箱上,37℃反应90~120min;

⑦ 然后加入100μL 5% BSA 和100μL 1% PEG20000,对未标记的位点进行封闭,置于旋转培养箱上,37℃反应60min;

⑧ 反应结束后,将上述液体2000rpm离心15min,弃上清,加入保存液(含1% BSA、10%蔗糖、2%海藻糖的pH8.0 0.2M 硼酸硼砂缓冲液),5mL,超声2s;

⑨ 将标记后的微球稀释50~100倍,每支200μL分装,即为单人份半成品,与类风湿因子、抗环瓜氨酸多肽抗体、C-反应蛋白测定试纸配合使用。

6. 根据权利要求5所述的一种类风湿性关节炎标志物联合定量检测试纸制备方法,所述类风湿性关节炎标志物联合定量检测试纸制备步骤:

① 用BIODOT 三维喷金点膜仪,以1μL/cm参数,在硝酸纤维素膜上包被类风湿因子、抗环瓜氨酸多肽抗体、C-反应蛋白相应的抗体三条检测线,和一条羊抗鼠/羊抗兔IgG质控线,

37℃干燥16小时,作为反应膜;

② 用含0.5% Tween-20的0.1 M PBS溶液浸泡玻璃纤维,然后37℃干燥16小时,裁剪17mm×300mm为作为样品垫;

③ 将样品垫、反应膜和吸水纸(22mm×300mm)以层层叠压的形式黏贴组装在底板上。

一种类风湿性关节炎标志物联合定量检测试纸及其制备方法

技术领域

[0001] 本发明属于生物医药领域,涉及基于用磁性稀土荧光微球作为示踪标记物的类风湿性关节炎标志物联合定量检测试纸及其制备方法,具体地说是,一种测定血液(血清、血浆、全血)中的类风湿因子/抗环瓜氨酸多肽抗体/C-反应蛋白含量的检测试剂卡。

背景技术

[0002] 类风湿性关节炎(rheumatoid arthritis ,RA)是一个累及周围关节为主的多系统性炎症性的自身免疫病,具体病因尚不清楚,可能与感染因子和遗传倾向两种因素有关,RA是以关节炎症的多变性、关节破坏、进行性功能障碍为特点的风湿性疾病,我国患病率约为0.3%-0.6%,是造成我国人群丧失劳动力和致残的主要病因之一。该病早期常因症状不典型被误诊或不能及时确诊,而延迟的治疗使该病的预后很差,如果能够早期确诊本病,并及时给予合理治疗,则会明显改善预后。RA的临床诊断类风湿因子(rheumatoid factor , RF)是常用的经典血清学指标,但是缺乏特异性,除了患者以外,还可见于结缔组织病、肝炎、肿瘤、感染性疾病等其他疾病以及正常健康人。尽管RF对RA是非特异的,但是高滴度的RF与RA疾病密切相关。特别是RF滴度越高,提示患者的预后越差,是损伤指标中最强有力的预后因子,其他自身抗体不能取代在诊断和预后判断中的地位。所以,由于RF在RA疾病中具有出现早、灵敏度高等优点,现在仍是临床早期诊断的主要依据之一。

[0003] 抗环瓜氨酸多肽抗体(cyclic citrullinated peptide ,CCP)在类风湿性关节炎早期出现,与RA患者的关节侵蚀状况和预后存在密切的相关性,抗CCP抗体对类风湿性关节炎的敏感性虽低于类风湿因子,但诊断的特异性接近95%,显著高于类风湿因子等其他临床诊断常用的指标,通过ELISA法检测RA患者的抗CCP抗体,并证明抗CCP抗体对RA诊断有很高的特异性及敏感性,国内目前抗CCP抗体正逐渐应用于对RA的临床诊断。抗CCP抗体是较好的RA早期诊断标志物,也是鉴别非侵蚀性、侵蚀性RA的灵敏指标。

[0004] C-反应蛋白(C-reactive protein ,CRP)是在机体受到感染或组织损伤时血浆中一些急剧上升的蛋白质(急性蛋白),激活补体和加强吞噬细胞的吞噬而起调理作用,清除入侵机体的病原微生物和损伤,坏死,凋亡的组织细胞。CRP在炎症开始数小时就升高,48小时即可达峰值,随着病变消退、组织、结构和功能的恢复降至正常水平。此反应不受放疗、化疗、皮质激素治疗的影响。因此,CRP的检测在临床应用相当广泛,包括急性感染性疾病的诊断和鉴别诊断,手术后感染的监测;抗生素疗效的观察;病程检测及预后判断等。

[0005] RF、抗CCP抗体、CRP三项指标联合用来诊断RA时,敏感性能得到明显的提高,与其他各单项相比,大大降低了漏诊率;同时阴性预测值也提高,如果RF、抗CCP抗体、CRP指标全为阴性,几乎可以排除患有RA的可能,具有相当高的临床应用价值。

[0006] 目前临床诊断应用最广泛的是采用进口试剂检测血清和血浆中的类风湿因子/抗环瓜氨酸多肽抗体/C-反应蛋白含量。现市面上的试剂盒检测操作复杂,费时,不宜作为普通的筛查,只能用作确诊试验。同时,与此同时市面上的样本进行稀释后进行测试而造成的灵敏度偏低。

发明内容

[0007] 为解决以上问题,方便测试人血清类风湿因子/抗环瓜氨酸多肽抗体/C-反应蛋白,本发明提供了一种简单、可靠、成本低廉、灵敏度高的类风湿性关节炎标志物联合定量检测试纸;本检测方法利用磁场将样本中的被测物质浓缩后,利用低背景、高灵敏度的荧光免疫层析法,进行检测被测物质,解决了POCT类产品灵敏度低的问题。可以避免免疫侧向层析试剂检测血液样本时,为降低血液中其他物质的干扰。

[0008] 为了达到本发明的目的,本发明提供的技术方案如下:一种类风湿性关节炎标志物联合定量检测试纸,所述类风湿性关节炎标志物为类风湿因子、抗环瓜氨酸多肽抗体、C-反应蛋白,所述类风湿性关节炎标志物联合定量检测试纸包括盒体,所述盒体包括底板与盒盖,所述盒体内设有检测试纸,所述检测试纸下方设有底板,检测试纸上方与盒盖连接;所述盒盖设有通孔区;所述通孔区设有加样孔和结果检测窗口;所述检测试纸上方设有检测区,检测区与通孔区相对应;所述检测区包括样品垫、类风湿性关节炎标志物抗体磁性稀土荧光微球标记垫、包被膜和吸水垫,所述包被膜上设有三条类风湿性关节炎标志物联合定量检测线和一条质控区C线,所述检测线与质控区C线平行排列。

[0009] 进一步,所述类风湿性关节炎标志物抗体磁性稀土荧光微球由高分子材料包裹磁性稀土荧光复合物,所述磁性稀土荧光微球的球径为 10-500nm,所述荧光发射波长范围为 400-800nm,纳米微球表面修饰活性基团为氨基、羧基或巯基。

[0010] 进一步,所述包被膜两端分别与吸水垫和类风湿性关节炎标志物抗体标记垫相互交叠连接,所述包被膜为硝酸纤维素膜;所述类风湿性关节炎标志物抗体标记垫上方压贴有样品垫,所述样品垫为玻璃纤维样品垫。

[0011] 进一步,所述类风湿性关节炎标志物抗体磁性稀土荧光微球标记垫为玻璃纤维或聚酯纤维。

[0012] 一种类风湿性关节炎标志物联合定量检测试纸制备方法,包括类风湿性关节炎标志物抗体标记与制备检测试纸,所述类风湿性关节炎标志物抗体标记步骤:

① 用羧基化聚苯乙烯微球包裹Eu³⁺-Fe₃O₄复合物制备的磁性稀土荧光微球,粒径200nm,固含量为1%;

② 取上述微球1mL,加入5mL pH 7.0 0.02M 3-(N-吗琳代)丙磺酸缓冲液(MOPS),混匀,25000rpm离心10min,弃上清;再加入5mL MOPS,90W超声,工作2s,间歇5s,重复2次,25000rpm离心10min,弃上清;

③ 再次加入5mL MOPS,90W超声,工作2s,间歇5s,重复2次,完成对微球的清洗;

④ 在清洗后微球中加入15mg EDC和50mg sulfo-NHS,涡旋混匀后,37℃反应15min;

⑤ 反应完成后,加入2-巯基乙醇8.6μl,终止羧基的活化;

⑥ 分别加入类风湿因子、抗环瓜氨酸多肽抗体、C-反应蛋白对应抗体各1mg,置于旋转培养箱上,37℃反应90~120min;

⑦ 然后加入100μL 5% BSA 和100μL 1% PEG20000,对未标记的位点进行封闭,置于旋转培养箱上,37℃反应60min;

⑧ 反应结束后,将上述液体2000rpm离心15min,弃上清,加入保存液(含1% BSA、10%蔗糖、2%海藻糖的pH8.0 0.2M 硼酸硼砂缓冲液),5mL,超声2s;

⑨ 将标记后的微球稀释50~100倍,每支200 μ L分装,即为单人份半成品,与类风湿因子、抗环瓜氨酸多肽抗体、C-反应蛋白测定试纸配合使用。

[0013] 类风湿性关节炎标志物联合定量检测试纸制备步骤:

① 用BIDOT 三维喷金点膜仪,以1 μ L/cm参数,在硝酸纤维素膜上包被类风湿因子、抗环瓜氨酸多肽抗体、C-反应蛋白相应的抗体三条检测线,和一条羊抗鼠/羊抗兔IgG质控线,37 $^{\circ}$ C干燥16小时,作为反应膜。

[0014] ② 用含0.5% Tween-20的0.1 M PBS溶液浸泡玻璃纤维,然后37 $^{\circ}$ C干燥16小时,裁剪17mm \times 300mm为作为样品垫。

[0015] ③ 将样品垫、反应膜和吸水纸(22mm \times 300mm)以层层叠压的形式黏贴组装在底板上。

[0016] 与现有技术相比,本发明具有如下有益效果:通过检测区包括样品垫、类风湿性关节炎标志物抗体磁性稀土荧光微球标记垫、包被膜和吸水垫,包被膜上设有三条类风湿性关节炎标志物联合定量检测线和一条质控区C线,利用磁场将样本中的被测物质浓缩后,利用低背景、高灵敏度的荧光免疫层析法,进行检测被测物质,解决了POCT类产品灵敏度低的问题。可以避免免疫侧向层析试剂检测血液样本时,为降低血液中其他物质的干扰。

附图说明

[0017] 图1是本发明类风湿因子测试曲线;

图2是本发明抗环瓜氨酸多肽抗体测试曲线;

图3是本发明C-反应蛋白测试曲线;

图4是本发明风湿因子测定方法精密度试验结果;

图5是本发明抗环瓜氨酸多肽抗体测定方法精密度试验结果;

图6是本发明C-反应蛋白测定方法精密度试验结果;

图7是本发明的结构示意图;

图中:1、底板;2、样品垫;3、类风湿性关节炎标志物抗体磁性稀土荧光微球标记垫;4、包被膜;5、吸水垫;6、盒体;61、盒盖;71、加样孔;72、结果观察窗口;8、类风湿性关节炎标志物联合定量检测线;9、质控区C线。

具体实施方式

[0018] 为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白,以下结合附图及实施例,对本发明进行进一步详细说明。应当理解,此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明,并不用于限定本发明。

[0019] 除非上下文另有特定清楚的描述,本发明中的检测物名称和参数,数量既可以单个的形式存在,也可以多个的形式存在,本发明并不对此进行限定。本发明中的步骤虽然用标号进行了排列,但并不用于限定步骤的先后次序,除非明确说明了步骤的次序或者某步骤的执行需要其他步骤作为基础,否则步骤的相对次序是可以调整的。可以理解,本文中所使用的术语“和/或”涉及且涵盖相关联的所列项目中的一者或一者以上的任何和所有可能的组合。

[0020] 一种类风湿性关节炎标志物联合定量检测试纸,所述类风湿性关节炎标志物为类

风湿因子、抗环瓜氨酸多肽抗体、C-反应蛋白,所述类风湿性关节炎标志物联合定量检测试纸包括盒体,所述盒体包括底板与盒盖,所述盒体内设有检测试纸,所述检测试纸下方设有底板,检测试纸上方与盒盖连接;所述盒盖设有通孔区;所述通孔区设有加样孔和结果检测窗口;所述检测试纸上方设有检测区,检测区与通孔区相对应;所述检测区包括样品垫、类风湿性关节炎标志物抗体磁性稀土荧光微球标记垫、包被膜和吸水垫,所述包被膜上设有三条类风湿性关节炎标志物联合定量检测线和一条质控区C线,所述检测线与质控区C线平行排列。所述类风湿性关节炎标志物抗体磁性稀土荧光微球由高分子材料包裹磁性稀土荧光复合物,所述磁性稀土荧光微球的球径为10-500nm,所述荧光发射波长范围为400-800nm,纳米微球表面修饰活性基团为氨基、羧基或巯基。所述包被膜两端分别与吸水垫和类风湿性关节炎标志物抗体标记垫相互交叠连接,所述包被膜为硝酸纤维素膜;所述类风湿性关节炎标志物抗体标记垫上方压贴有样品垫,所述样品垫为玻璃纤维样品垫。所述类风湿性关节炎标志物抗体磁性稀土荧光微球标记垫为玻璃纤维或聚酯纤维。

[0021] 实施例1,检测方法的建立:

1.1聚苯乙烯微球种子的制备

1.1.1 量取100ml的苯乙烯与分液漏斗中,用1 M NaOH反复洗涤3次,除去苯乙烯中的杂质,然后用纯化水洗涤至中性,然后置入干燥皿中干燥24h以上;

1.1.2 将氩气充入反应装置中,除去装置中的氧气;

1.1.3 在反应装置中加入100ml的乙醇,然后加入5g PVP,搅拌30min;

1.1.4 加入40ml已洗涤过的苯乙烯和5ml偶氮二异丁腈(AIBN),水浴升温至45℃,反应30min,然后将反应温度升高至75℃,反应12h;

1.1.5 反应结束后,用网筛过滤上述反应液,然后用无水乙醇洗涤离心3~5次,然后将初步除杂后的聚合物在40%乙醇中,使其自然沉淀,称取沉淀重量。

[0022] 1.2聚苯乙烯表面的羧基化修饰

1.2.1 将上述分散所得的聚苯乙烯微球作为种子1g,用10ml 0.25% SDS将其分散;

1.2.2 然后在上述体系中加入2倍种子重量的环己烷,35℃溶胀16~18h;

1.2.3 称取0.02g过氧化苯甲酰、量取10μl乙二醇独甲醚和10μl二甲基苯烯酸乙二醇酯,分别加入至上述反应液中,继续溶胀12h;

1.2.4 溶胀结束后,加入2.5mg PVA,提高反应温度至75℃,继续反应10~12h;

1.2.5 用乙醇反复洗涤3次,除去未反应的单体和低聚物,然后20000rpm离心沉降微球。

[0023] 1.3 磁性-荧光纳米微球的制备

1.3.1 将FeCl₂、FeCl₃、EuCl₃、NaOH溶液,按摩尔比例Fe²⁺:Fe³⁺:Eu³⁺:Na⁺=1:1:2:5,将其溶液进行混合,搅拌反应,得到沉淀,陈化3~5h后过滤,用纯化水洗涤2~3次,干燥、研磨后获得Eu³⁺-Fe₃O₄复合物。

[0024] 1.3.2 取0.1g羧基化修饰的聚苯乙烯微球,加入至20ml异丙醇中,超声分散10min;

1.3.3 称取Eu³⁺-Fe₃O₄复合物0.5mg,加入至5ml氯仿中,超声分散20min;

1.3.4 将1.3.2和1.3.3中的两种液体混合,真空环境中控放置5~6h,然后再置于常压2~3h;

1.3.5 将溶胀后的微球用乙醇洗涤3次,用磁场除去未能成功包裹磁微粒的微球,用适量含0.05%叠氮钠水溶液重悬,即得磁性稀土荧光微球,2~8℃保存,严禁冰冻。

[0025] 1.4 抗体的标记

1.4.1 取上述制备的200nm、固含量为1%的微球1ml,加入5ml pH 7.0 0.02M 3-(N-吗琳代)丙磺酸缓冲液(MOPS),混匀,25000rpm离心10min,弃上清;

1.4.2 再加入5ml MOPS,90W超声,工作2s,间歇5s,重复2次,25000rpm离心10min,弃上清;

1.4.3 再次加入5ml MOPS,90W超声,工作2s,间歇5s,重复2次,完成对微球的清洗;

1.4.4 在清洗后微球中加入15mg EDC和50mg sulfo-NHS,涡旋混匀后,37℃反应15min;

1.4.5 反应完成后,加入2-巯基乙醇8.6μl,终止羧基的活化;

1.4.6 分别加入类风湿因子、抗环瓜氨酸多肽抗体、C-反应蛋白的相应的抗体各1mg,置于旋转培养箱上,37℃反应90~120min;

1.4.7 然后加入100μl 5% BSA 和100μl 1% PEG20000,对未标记的位点进行封闭,置于旋转培养箱上,37℃反应60min;

1.4.8 反应结束后,将上述液体2000rpm离心15min,弃上清,加入保存液(含1% BSA、10%蔗糖、2%海藻糖的pH8.0 0.2M 硼酸硼砂缓冲液),5ml,超声2s;

1.4.9 将标记后的微球稀释50~100倍,每支200μl分装,即为单人份半成品,与类风湿因子/抗环瓜氨酸多肽抗体/C-反应蛋白测定试纸配合使用。

[0026] 1.5 测试试纸的制备

1.5.1 用BIODOT 三维喷金点膜仪,以1μl/cm参数,在硝酸纤维素膜上包被类风湿因子抗体、抗环瓜氨酸多肽抗体抗体、C-反应蛋白相应的抗体三条检测线,和一条羊抗鼠/羊抗兔IgG质控线,37℃干燥16小时,作为反应膜。

[0027] 1.5.2 用含0.5% Tween-20的0.1 M PBS溶液浸泡玻璃纤维,然后37℃干燥16小时,裁剪17mm×300mm作为样品垫。

[0028] 1.5.3 将样品垫、反应膜和吸水纸(22mm×300mm)以层层叠压的形式进行黏贴组装在PVC底板上,切条后,即为类风湿因子/抗环瓜氨酸多肽抗体/C-反应蛋白测定试纸,置入塑料卡盒中,即为类风湿因子/抗环瓜氨酸多肽抗体/C-反应蛋白测定试剂卡。

[0029] 实施例2,类风湿因子、抗环瓜氨酸多肽抗体、C-反应蛋白检测方法

2.1 线性范围

2.1.1 分别将接近线性范围上限的高值样本按照一定比例稀释为至少5种浓度,其中低值浓度的样本须接近线性范围的下限;

2.1.2 上述各浓度样本各取100μl,分别加入到分装后的标记微球中,涡旋混匀;

2.1.3 将以上反应液置于磁场上,1min后,弃去上清,然后每支加入200μl PBS(0.02M, pH7.4);

2.1.4 撤去磁场,再次涡旋混匀,将以上各浓度样本分别取100μl,加入至类风湿因子/抗环瓜氨酸多肽抗体/C-反应蛋白测定试纸中,每浓度重复测试3次;

2.1.5 反应10min后,将试纸放入干式免疫荧光分析仪中,读取T/C值,计算各浓度的T/C均值,采用双对数直线拟合浓度-反应曲线(X轴为lg(浓度);Y轴为lg(T/C)),如图所示,类

风湿因子反应曲线为 $y = 1.0581x - 1.1134$, $R=0.9964$; 抗环瓜氨酸多肽抗体反应曲线为 $y = 1.3833x - 2.4438$, $R=0.9905$; C-反应蛋白反应曲线为 $y = 0.5475x - 0.1391$, $R=0.9907$ 。

[0030] 2.2 最低检出限

将阴性血清按2.1.2~2.1.4操作, 重复测试20次, 计算T/C均值, 将其代入2.1.5测试曲线中, 得出本方法的最低检出限, 其中类风湿因子最低检出限为3IU/mL; 抗环瓜氨酸多肽抗体最低检出限为7U/mL; C-反应蛋白最低检出限为0.2mg/L。

[0031] 2.3 精密度

将校准品稀释至高、中、低三个浓度, 按2.1.2~2.1.4操作, 每浓度重复测试10次。结果为图1-图3所示, 由此可以看出, 本方法测试的变异系数均小于10%, 因此具有较高的精密度。

[0032] 2.4 与其他产品的比较

本方法测试92份临床血清, 与市场上其他产品测值相关性, 类风湿因子结果为: $y = 0.9631x + 0.5134$, 其相关系数为0.975, 抗环瓜氨酸多肽抗体结果为: $y = 0.9426x + 0.7012$, 其相关系数为0.984, C-反应蛋白结果为: $y = 0.9755x + 0.6312$, 其相关系数为0.967, 表明本试剂与已上市的检测方法具有良好的一致性。

[0033] 综合可知, 本方法可检测类风湿因子、抗环瓜氨酸多肽抗体、C-反应蛋白, 具有较好的精密度, 测试变异系数均 $<10\%$ 。经临床测试, 并与已上市产品具有良好的相关性。本发明利用磁场将样本中的被测物质浓缩后, 利用低背景、高灵敏度的荧光免疫层析法, 进行检测被测物质, 解决了POCT类产品灵敏度低的问题。可以避免免疫侧向层析试剂检测血液样本时, 为降低血液中其他物质的干扰, 通常将样本进行稀释后进行测试而造成的灵敏度偏低的问题。

[0034] 上述实施例仅例示性说明本发明的原理及其功效, 而非用于限制本发明。任何熟悉此技术的人士皆可在不违背本发明的精神及范畴下, 对上述实施例进行修饰或改变。因此, 举凡所属技术领域中具有通常知识者在未脱离本发明所揭示的精神与技术思想下所完成的一切等效修饰或改变, 仍应由本发明的权利要求所涵盖。

类风湿因子测试曲线

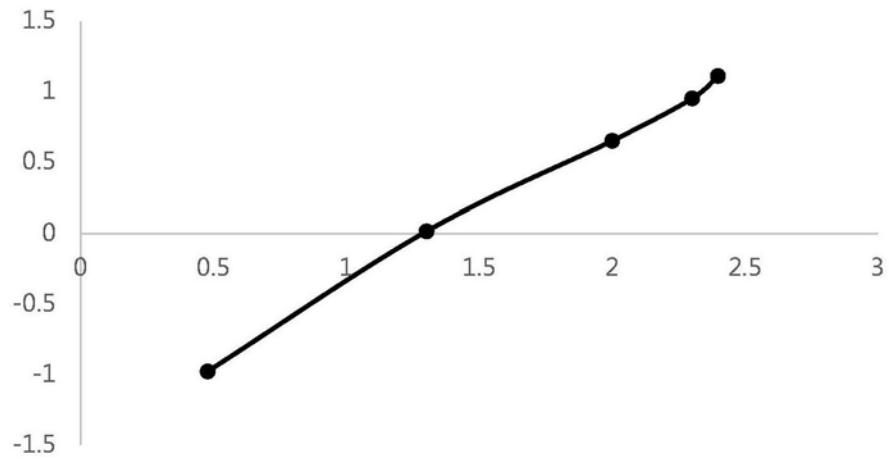


图1

抗环瓜氨酸多肽抗体测试曲线

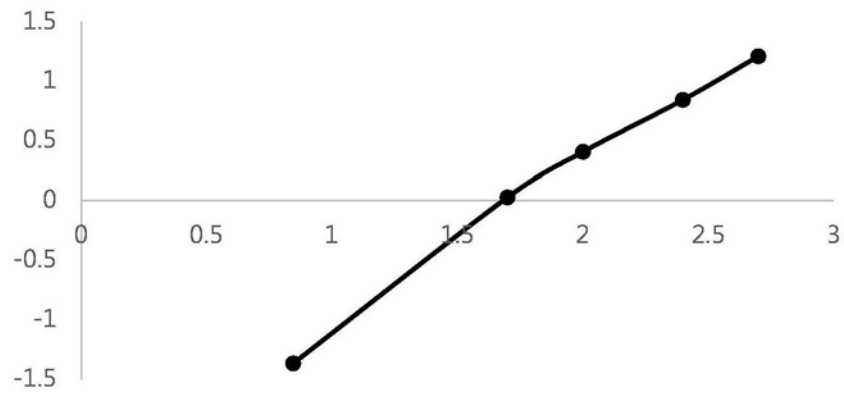


图2

C-反应蛋白测试曲线

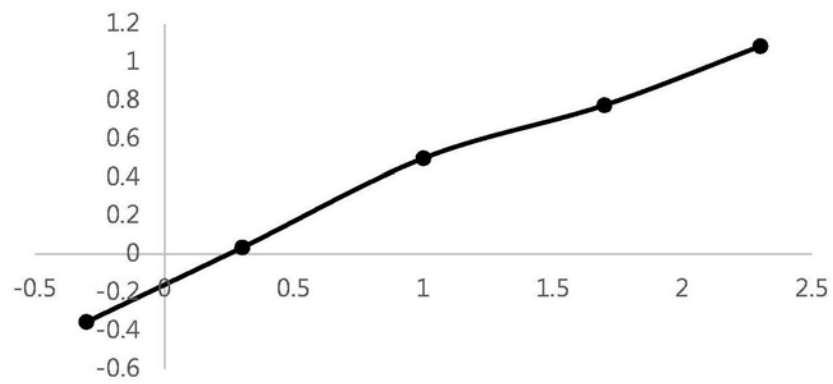


图3

类风湿因子测定方法精密度试验结果

浓度 (IU/mL) 测试	17	100	250
Test 1	17.30	90.83	232.15
Test 2	18.39	95.82	242.86
Test 3	18.47	102.62	271.47
Test 4	16.71	99.37	266.70
Test 5	17.35	107.62	243.32
Test 6	17.63	101.93	254.56
Test 7	17.82	94.85	270.44
Test 8	18.09	93.39	245.90
Test 9	17.64	90.49	248.23
Test 10	15.43	104.63	264.75
均值	17.48	98.16	254.04
SD 值	0.85	5.65	12.91
CV	4.85%	5.75%	5.08%

图4

抗环瓜氨酸多肽抗体测定方法精密度试验结果

浓度 (U/mL) 测试	3	20	200
Test 1	2.74	20.54	218.52
Test 2	3.19	20.67	212.10
Test 3	3.24	18.84	193.77
Test 4	3.05	19.68	206.02

Test 5	2.97	20.56	182.33
Test 6	2.76	20.93	216.86
Test 7	3.29	20.96	190.06
Test 8	2.71	19.53	210.03
Test 9	3.24	18.56	195.45
Test 10	3.13	19.06	191.15
均值	3.03	19.93	201.63
SD 值	0.21	0.86	11.97
CV	7.03%	4.32%	5.94%

图5

C-反应蛋白测定方法精密度试验结果

浓度 (mg/L) 测试	10	50	150
Test 1	9.24	48.49	150.34
Test 2	10.48	45.17	154.09
Test 3	10.79	54.29	139.43
Test 4	9.12	45.51	154.61
Test 5	9.64	48.64	157.45
Test 6	9.87	45.49	154.92
Test 7	9.32	53.40	151.44
Test 8	10.04	48.22	148.80
Test 9	9.98	49.79	140.48
Test 10	10.48	46.18	160.98
均值	9.90	48.52	151.25
SD 值	0.54	3.06	6.55
CV	5.48%	6.31%	4.33%

图6

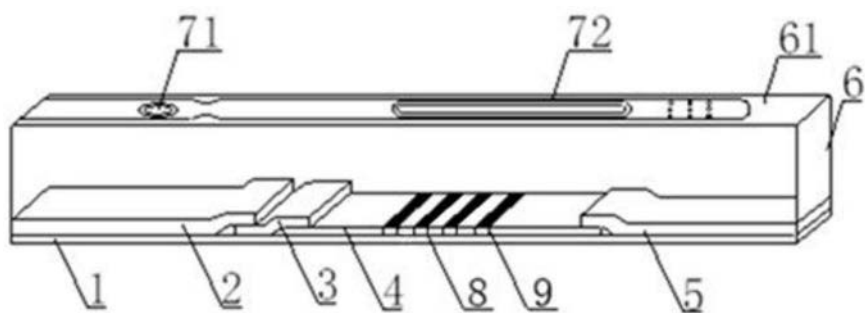


图7

专利名称(译)	一种类风湿性关节炎标志物联合定量检测试纸及其制备方法		
公开(公告)号	CN108956982A	公开(公告)日	2018-12-07
申请号	CN201810746013.1	申请日	2018-07-09
[标]发明人	于龙波 于永涛 黎权 刘日俊		
发明人	于龙波 于永涛 黎权 刘日俊		
IPC分类号	G01N33/564 G01N33/533 G01N33/543 G01N33/58 G01N33/68		
CPC分类号	G01N33/564 G01N33/533 G01N33/54326 G01N33/582 G01N33/587 G01N33/68 G01N2446/10 G01N2800/24		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

一种类风湿性关节炎标志物联合定量检测试纸，所述类风湿性关节炎标志物为类风湿因子、抗环瓜氨酸多肽抗体与C-反应蛋白，试纸条包括样品垫、类风湿性关节炎标志物抗体磁性稀土荧光微球标记垫、包被膜和吸水垫，包被膜上设有三条类风湿性关节炎标志物定量检测线和一条质控区C线，利用磁场将样本中的被测物质浓缩后，利用低背景、高灵敏度的荧光免疫层析法，进行检测被测物质，解决了POCT类产品灵敏度低的问题。可以避免免疫侧向层析试剂检测血液样本时，为降低血液中其他物质的干扰。

类风湿因子测定方法精密度试验结果

测试 \ 浓度 (IU/mL)	17	100	250
Test 1	17.30	90.83	232.15
Test 2	18.39	95.82	242.86
Test 3	18.47	102.62	271.47
Test 4	16.71	99.37	266.70
Test 5	17.35	107.62	243.32
Test 6	17.63	101.93	254.56
Test 7	17.82	94.85	270.44
Test 8	18.09	93.39	245.90
Test 9	17.64	90.49	248.23
Test 10	15.43	104.63	264.75
均值	17.48	98.16	254.04
SD 值	0.85	5.65	12.91
CV	4.85%	5.75%	5.08%